

REMARKS

Applicants respectfully request the Examiner to reconsider the present application in view of the foregoing amendments to the claims.

Status of the Claims

In the present Reply, claims 2 and 16 have been canceled herein without prejudice or disclaimer of the subject matter contained therein. Also, claim 12 was previously canceled. In addition, claims 1, 3, 15 and 16 have been amended. Claims 5-10, 13 and 14 stand withdrawn from consideration. Thus, claims 1, 3-11, 13-15 and 17 are pending in the present application.

No new matter has been added by way of these amendments. The amendment to claim 1 merely incorporates the subject matter of canceled claim 2. The amendment to claim 1 is also supported throughout the present specification, such as page 23, lines 2-14. With the amendment to claim 1, claims 3 and 15-16 were appropriately amended. Thus, no new matter has been added.

Based upon the above considerations, entry of the present amendment is respectfully requested.

In view of the following remarks, Applicants respectfully request that the Examiner withdraw all rejections and allow the currently pending claims.

Withdrawal of Rejections

Applicants note that the rejection of claim 17 under 35 U.S.C. § 112, first paragraph, has been withdrawn; the rejection of claims 2, 3, 15 under 35 U.S.C. § 112, second paragraph has also been withdrawn; and the rejection of claims 1-4, 11, and 15 under 35 U.S.C. § 102(e) as being anticipated by U.S. Patent No. 5,800,814 has been withdrawn.

Issues Under 35 U.S.C. § 112

Claims 1-4, 11 and 15-17 are rejected under 35 U.S.C. § 112, first paragraph, as failing to comply with the written description requirement. This rejection is respectfully traversed. Reconsideration and withdrawal thereof are respectfully requested.

Applicants had possession of the claimed invention, at the time of filing the present application. The enzyme as claimed according to the present invention may be summarized as follows:

- (1) It is an aspartic enzyme;
- (2) It produces plasma protein fragments having inhibitory activity to metastasis and growth of cancer;
- (3) It has a molecular weight of about 45 kDa as measured by SDS electrophoresis under non-reduction condition;
- (4) It has the N-terminal amino acid sequence LVRIPLHKFT;
- (5) It degrades plasma proteins at an acidic pH range of not more than pH 5.0 to produce the mentioned plasma protein fragments having an inhibitory activity; and

(6) It is an aspartic enzyme having N-terminal amino acid sequence homology to a cathepsin D precursor.

Among the features described above, the features of “having a molecular weight of about 45kDa” and of “acting at an acidic pH range of not more than pH 5.0” (see features (3) and (5) above) are traits commonly shared by an aspartic enzyme. These two features thus specify the enzyme of the present invention as an aspartic enzyme. In other words, one of skill in the art would understand that such claim limitations sufficiently define the structural features of the instantly claimed invention as being an aspartic enzyme.

Still, the Examiner states in the Office Action that “there is no information regarding the remaining residues, i.e. carboxy terminus” (see the Office Action at page 3, lines 5-7 from the bottom of the page). Regarding such a concern, Applicants respectfully refer the Examiner to the other instantly claimed features. Specifically, Applicants respectfully submit that the features of “having N-terminal amino acid sequence homology to a cathepsin D precursor,” and “having the N-terminal amino acid sequence LVR IPLHKFT,” as well as “producing plasma protein fragments having an inhibitory activity to metastasis and growth of cancer” (see features (2), (4) and (6) above), are features that exclude many other types of aspartic enzymes. As mentioned, the present invention as claimed already refers to aspartic enzymes (acting in acidic environment) of certain size (molecular weight of about 45kDa). With these additional features (2), (4) and (6), and regarding the Examiner’s concern of needing more structural features (or structure: function correlation), Applicants respectfully submit that the N-terminal amino acid sequence of LVR IPLHKFT is sufficient for defining the structure of the enzyme of the present

invention, and is further distinguishable from any other types of aspartic enzymes having distinct N-terminal amino acid sequences. To support Applicants' position, Applicants herein submit "Evidence A." Evidence A depicts the N-terminal amino acid sequence of cathepsin D as compared with those of other aspartic enzymes, including cathepsin E, pepsinogen and rennin.

Furthermore, the feature of "producing plasma protein fragments having an inhibitory activity to metastasis and growth of cancer" aids in distinguishing the enzyme of the present invention from other types of aspartic enzymes. Applicants herein submit "Evidence B" (consisting of 8 pages). As shown in Evidence B, there was a recent study that demonstrates cathepsin E, though being an aspartic enzyme like cathepsin D, produces plasma protein fragments having a different activity from that produced by the enzyme of the present invention. More specifically, cathepsin D specifically degrades plasminogen to produce angiostatin, while cathepsin E specifically degrades collagen XVIII to produce endostatin (see translated part of Evidence B). Thus, the feature of "producing plasma protein fragments having an inhibitory activity to metastasis and growth of cancer" is distinguishing from other aspartic enzymes, like cathepsin E.

Applicants further note that the primary consideration here is factual and depends on the nature of the invention and the amount of knowledge imparted to those skilled in the art by the disclosure. *In re Wertheim*, 541 F.2d 257, 262, 191 USPQ 90, 96 (CCPA 1976). One of skill in the art would have scientific literature at hand, such as Evidence A and Evidence B, to understand and realize the scope of what is instantly claimed. Thus, the written description requirement is met for all presently pending claims since the mentioned functional

characteristics, such as producing the mentioned plasma protein fragments, correlate with the other structural features as claimed, such as “having N-terminal amino acid sequence homology to a cathepsin D precursor” and “having the N-terminal amino acid sequence LVRIP LHKFT”.

In summary, Applicants respectfully submit that these recited features (e.g., the claimed molecular weight) addresses the Examiner’s concern of how “there is no information regarding the remaining residues, i.e. carboxy terminus”. Further, based on Evidence A and Evidence B, one of skill in the art would understand that Applicants had possession of the claimed invention (at the time of filing of this application). In other words, the mentioned attachments support Applicants’ position that the claimed features of, e.g., having N-terminal amino acid sequence homology to a cathepsin D precursor,” and “having the N-terminal amino acid sequence LVRIP LHKFT,” as well as “producing plasma protein fragments having an inhibitory activity to metastasis and growth of cancer” recite sufficient structure: function correlation as understood by one of skill in the art. Accordingly, Applicants respectfully that the claimed aspartic enzyme, as defined by the features that well distinguish said enzyme from any other types of aspartic enzymes both from viewpoint of structure and function, excludes and does not encompass such other types of aspartic enzymes such that the claimed genus is not as broad as asserted by the Examiner.

Therefore, reconsideration and withdrawal of this rejection is respectfully requested.

Issues Under 35 U.S.C. § 102

Claims 1-4, 11 and 15 stand rejected under 35 U.S.C. § 102 as being anticipated by "Gately et al." (*Cancer Research*, Vol. 56, pp. 4998-4890, November 19, 1996) (rejection is reinstated; see paragraph 7 of the Office Action). Applicants respectfully traverse, and reconsideration and withdrawal thereof are respectfully requested.

Distinctions over the Gately et al. reference

The Examiner asserts that the factor identified by Gately et al. inherently comprises the claimed enzyme and that the supernatant containing the enzyme was separate from the cell culture source, thereby inherently isolated from said source, since the starting material of Gately et al. is the same as that of Applicants (see the Office Action at page 6, starting at line 6). Applicants respectfully disagree.

Contrary to the Examiner's remarks, the factor (enzyme) identified by Gately et al. is distinct from the claimed aspartic enzyme. Applicants draw the Examiner's attention to the fact that the enzyme of the present invention is an aspartic enzyme, acting at an acidic pH range of pH 5.0 or less. In contrast, the enzyme identified by Gately et al. is a serine protease, acting only at neutral pH, but not acting at an acidic pH range. Applicants' position is further supported by the previously submitted Declaration (filed with the Supplemental Reply of July 22, 2004). Still, the Examiner refers to the supernatant of Gately et al.

However, even if the PC-3 culture supernatant is the same starting material commonly used by both Gately et al. and the present inventors, it is definitely true that Gately et al could not discover or isolate the aspartic enzyme of the present invention. Specifically, as Gately et al.

themselves approved therein, i.e., as shown its Table 1 on page 4889, the enzymatic activity of Gately et al. is inhibited by a *serine protease inhibitor*, but not by an *aspartic protease inhibitor* (Applicants note that it says "None" next to aspartic proteinases in the Table). Such disclosure undoubtedly demonstrates that said enzymatic activity is due a serine protease, and not due an aspartic enzyme. Thus, Applicants respectfully disagree in that Gately et al. disclose the present invention.

Accordingly, Applicants submit that the claimed enzyme is not disclosed in Gately et al. and that this rejection has been overcome. This is because "a claim is anticipated only if each and every element as set forth in the claim is found, either expressly or inherently described, in a single prior art reference". See *Verdegaal Bros. v. Union Oil Co. of California*, 814 F.2d 628, 631, 2 USPQ2d 1051, 1053 (Fed. Cir. 1987). Thus, because of the lack of disclosure of all features as instantly claimed, the rejection in view of Gately et al. is overcome. Reconsideration and withdrawal are respectfully requested.

Information Disclosure Statement

Applicants have not yet received a copy of the PTO-1449 form having the Examiner's initial next to each considered reference for two Information Disclosure Statements. The first IDS was filed on December 19, 2002; the second IDS was filed on April 10, 2003. Also, Applicants have checked the USPTO's PAIR website to confirm that the USPTO has received the Information Disclosure Statements. Thus, Applicants respectfully request a copy from the Examiner of the PTO-1449 form for each IDS.

Conclusion

A full and complete response has been made to all issues as cited in the Office Action. Applicants have taken substantial steps in efforts to advance prosecution of the present application. Thus, Applicants respectfully request that a timely Notice of Allowance issue for the present case.

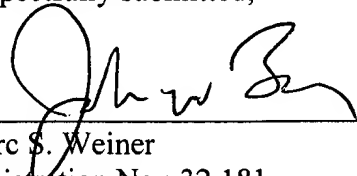
If the Examiner believes that personal communication will expedite prosecution of this application, the Examiner is invited to contact Eugene T. Perez (Reg. No. 48,501) at the offices of Birch, Stewart, Kolasch & Birch, LLP.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. §§1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Dated: August 19 2005

Respectfully submitted,

Attachments: Evidence A (1 page)
Evidence B (8 pages)

By  #32,821

Marc S. Weiner
Registration No.: 32,181
BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP
8110 Gatehouse Rd
Suite 100 East
P.O. Box 747
Falls Church, Virginia 22040-0747
(703) 205-8000
Attorneys for Applicant

Evidence A

BEST AVAILABLE COPY

List of Aspartic enzymes with their N-terminal amino acid sequences wherein possibly homologous region is underlined

Cathepsin D

N- lyriplhkft sirrtmsevg gsvedliakg pvsksqav

Cathepsin E

N- apga lhryplsrrr sirkkllragg qltelwksqn lnmdqcstiq

Pepsinogen

N- avvkvpkkfk siretnkekgilgefi rthkydpawk yrfgdlsvty

Renin

N- iflkrmpp sireslkerg vdmasslpew

*** Source ***

Cathepsin D

AUTHORS Faust, P. L., Kornfeld, S. and Chirgwin, J. M.

TITLE Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D

JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 (15), 4910-4914 (1985)

Cathepsin E

AUTHORS Tatnell, P. J., Cook, M. and Kay, J.

TITLE An alternatively spliced variant of cathepsin E in human gastric adenocarcinoma cells

JOURNAL Biochim. Biophys. Acta 1625 (2), 203-206 (2003)

Pepsinogen

AUTHORS Hayano, T., Sogawa, K., Ichihara, Y., Fujii-Kuriyama, Y. and Takahashi, K.

TITLE Primary structure of human pepsinogen C gene

JOURNAL J. Biol. Chem. 263 (3), 1382-1385 (1988)

Renin

AUTHORS Morris, B. J.

TITLE New possibilities for intracellular renin and inactive renin now that the structure of the human renin gene has been elucidated

JOURNAL Clin. Sci. 71 (4), 345-355 (1986)

Partial Translation of Evidence B

Title: PRODUCTION MECHANISM OF ANGIOGENIC INHIBITORS AND
TUMOR SUPPRESSION

5 Authors: Jun-ichi Iwata and Kenji Yamamoto

Source: "Protein, Nucleic Acid, Enzyme", Vol. 48, No. 14, pp.
1928-1933, 2003

10 (pp. 1928)

Abstract:

.....

15 **Angiostatin** and **endostatin** are endogenous angiogenic
inhibitors that are produced by degradation of **plasminogen**
and **collagen XVIII**, respectively.

.....

20 Recently, the authors have found out that **cathepsin D** and
cathepsin E secreted from cancer cells are enzymes
responsible for production of **angiostatin** and **endostatin**,
respectively.

(pp. 1929, left column, lines 17-22)

25

Recently, the authors have found out that **cathepsin D** and
cathepsin E, endosomal/lysosomal aspartic proteases secreted
from cancer cells, specifically degrade **plasminogen** and
collagen XVIII to produce **angiostatin** and **endostatin**,
30 respectively.

(pp. 1929)

Table 1:

Endogenous angiogenic inhibitors produced by proteases

Endogenous angiogenic inhibitors	Enzymes produced	Action
Angiostatin	Cathepsin D, MMP, Plasmin	Inhibition of proliferation and migration of vascular endothelial cells, Induction of apoptosis
Endostatin	Cathepsin E, Cathepsin L, MMP-9	Inhibition of proliferation of vascular endothelial cells, Inhibition of lumen formation
.....

5

(pp. 1930)

Table 2:

10 Functional features of cathepsin D and cathepsin E in tumor

	Cathepsin D	Cathepsin E
Inhibitory mechanism to angiogenesis	Angiostatin	Endostatin
Substrate	Plasminogen	Collagen XVIII
Optimal pH	4.0	6.0
Content of sialic acid	Dependent	Not dependent
Tumor proliferation	Inhibition	Inhibition
Metastasis	Not known	Inhibition

Short Review

血管新生阻害因子の産生機構と腫瘍抑制

岩田淳一・山本健二

腫瘍組織が一定の大きさをこえて発育増殖するためには、おもに腫瘍細胞から分泌される血管新生促進因子による新たな血管新生が必要不可欠である。一方、腫瘍部位では血管新生阻害因子も産生され、腫瘍の発育増殖を抑制することが知られている。阻害因子の作用が促進因子の作用を上まわれれば、腫瘍は栄養補給を断たれ休眠状態ないし壊死に陥るとされている。アンジオスタチンおよびエンドスタチンは、それぞれプラスミノゲンおよびコラーゲンXVIIIの分解によって産生される内在性血管新生阻害因子である。しかし、これらを生体内で産生する責任酵素は何なのか、また、それらの作用メカニズムはどのようにになっているのか、などについては不明な点が多い。筆者らは、最近、癌細胞から分泌されるカテプシンDおよびカテプシンEがそれぞれアンジオスタチンおよびエンドスタチンを産生する責任酵素であることを明らかにした。本稿では、これらのプロテアーゼに焦点をあて、それらの作用機序について概説する。

Key words カテプシンD カテプシンE 血管新生 悪性腫瘍

はじめに

血管新生は発生・分化や創傷治癒過程に必須の機構であるが、その一方で疾患の発症進展を促すこともよく知られている。病的血管新生は、固形腫瘍の発育増殖や浸潤・転移過程、糖尿病および未熟児網膜症の発症・進展過程、関節リウマチの慢性炎症時などでよく観察される。現在、これらの難治性疾患に対する効果的な治療法の開発が緊急課題として検討されているなか、血管新生阻害療法はこれら疾病に対して新たな方法論を提供するものと期待されている。なかでも、腫瘍血管新生阻害療法は、癌細胞そのものを標的とする既存の治療法と異なり、癌細胞の変異による耐性を生じにくいなどの理由から有望な治療戦略と考えられている。実際、1995年ごろから血管新生を阻害する物質の探索が精力的に行なわれ、表1に示すような多様な阻害物質が報告され、こうした阻害物質の一部を用いた腫瘍血管新生阻害療法が米国を中心に進められている。しかし、血管新生が複雑なステップの反応であることや、阻害物質の *in vivo* での

作用が一様でないことなどもあって、今のところ期待される成績からはほど遠い状況にある。

アンジオスタチン(angiotatin)およびエンドスタチン(endostatin)は血管新生を強力に阻害する内在性血管新生阻害因子で、それぞれプラスミノゲンおよびコラーゲンXVIIIが腫瘍から分泌される何らかのプロテアーゼによって分解されてできるポリペプチドである。これらは増殖している血管内皮細胞に選択的に作用し、休止期にある正常な血管内皮細胞には作用しないという特徴をもっている。しかし、これまで、アンジオスタチンおよびエンドスタチンの産生酵素の同定や作用機序には不明な点が多かった。これら血管新生阻害因子を産生するヒト癌細胞のプロテアーゼはいったい何なのか、その発現量や性状は腫瘍の悪性度にどう関係するのか、それらは血管新生阻害療法の開発につながるのか、などといった疑問に対して、筆者らの最近の解析結果と得られた知見を紹介する。

Jun-ichi Iwata, Kenji Yamamoto, 九州大学大学院歯学研究院口腔常態制御学講座口腔機能分子科学分野 E-mail: jun-iwt@dent.kyushu-u.ac.jp

Involvement of cathepsin D and cathepsin E in the inhibition of tumor growth and metastasis through the production of angiogenic inhibitors

I. 腫瘍血管新生とプロテアーゼ

トリプシン、プラスミン、カリクレインなどのセリンプロテアーゼの阻害剤が癌の増殖や転移を抑制すること¹⁾、リソソーム性システインプロテアーゼのカテプシンBやカテプシンLの阻害剤に浸潤抑制効果があること²⁾、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の阻害剤に癌の増殖・浸潤・転移抑制効果があること³⁾などから、悪性腫瘍におけるプロテアーゼは生体侵襲や転移をひき起こす悪玉として考えられてきた。しかし、最近の*in vitro*のモデル実験から、腫瘍細胞から分泌されるプロテアーゼのなかに血管新生阻害因子を産生するものが含まれていることが発見され、これらが血管新生阻害因子の産生を介して間接的に悪性腫瘍の発育増殖を抑制することが示唆された。つまり、血管新生阻害因子の産生プロテアーゼは悪性腫瘍に対して善玉として作用すると考えられ、血管新生阻害療法の新たな標的分子になる可能性を示唆するものである。

最近、筆者らは、腫瘍細胞から分泌されるエンドソーム・リソソーム性アスパラギン酸プロテアーゼのカテプシンDおよびカテプシンEがそれぞれプラスミノゲンおよびコラーゲンXVIIIを特異的に分解してアンジオスタチンおよびエンドスタチンを産生することを明らかにした。両酵素は、本来、エンドソーム・リソソーム系蛋白質分解システムにおいて重要な役割を果たしている^{4,5)}が、腫瘍細胞や活性化された抗原提示細胞では一部が細胞外に分泌され、細胞外蛋白質の分解に関与することが知られている。

II. アンジオスタチン産生とカテプシンD

アンジオスタチンは、内因性血管新生阻害因子として1994年にO'Reillyらによって同定された分子量38Kのポリペプチドで、前駆基質プラスミノゲンのクリングルドメイン(K1~K4)のうち少なくとも3つを含んでいる⁶⁾。*in vitro*の実験系では、MMP-12⁶⁾、ウロキナーゼ⁷⁾などのプロテアーゼがアンジオスタチンの産生に関与するとされたが、これらが*in vivo*の真のアンジオスタチン産生酵素かどうかは明らかにされていなかった。

筆者らは、プラスミノゲンがヒト前立腺癌細胞(PC3)の産生するカテプシンDによって特異的に切断され、アンジオスタチンを産生することを見いだした(図1)。また、本酵素はアンジオスタチン産生過程でプラスミンを分解し、プラスミンの産生を阻害することによって血管新生促進因子VEGF(vascular endothelial growth factor)の潜在型から活性型への変換を阻害することを明らかにし、二重のメカニズムで血管新生を抑制することを報告した^{8,9)}。さらにそのなかで、ヒト乳癌細胞(MCF7)が分泌しているカテプシンDは、PC3細胞から分泌される分子に比べて、同じ酵素量であっても、プラスミノゲンからアンジオスタチンを産生する活性が著しく低いことを報告した⁸⁾。

その後の研究から、カテプシンD分子のアンジオスタチン産生能の差は、腫瘍の発生臓器の違いによるのではなく、腫瘍細胞の発育増殖能(悪性度)に依存していることが明らかとされた。つまり、同じ腫瘍細胞が分泌するカテプシンDであっても、悪性度が高いと判定され

◎ 表1 プロテアーゼによって産生される内在性血管新生阻害因子

内在性血管新生阻害因子	産生酵素	作用機序
アンジオスタチン	カテプシンD ⁸⁾ , MMP ⁶⁾ , プラスミン ⁵⁾	血管内皮細胞の増殖・遊走阻害とアポトーシス誘導
エンドスタチン	カテプシンE, カテプシンL ¹⁰⁾ , MMP-9 ¹¹⁾	血管内皮細胞の増殖阻害と管腔形成阻害
16K プロラクチン断片	カテプシンD ¹⁰⁾	血管内皮細胞の増殖阻害
キニノスタチン	不明	血管内皮細胞の遊走・増殖阻害
2本鎖アンチトロンビン	トロンビン, エラスターゼ	血管内皮細胞の増殖阻害
プロトロンビン分解産物	不明	血管内皮細胞の増殖阻害
キャンスタチン/ツムスタチン/アレステン	不明	血管内皮細胞の増殖・遊走・管腔形成阻害
ハノスタチン	不明	血管内皮細胞の増殖阻害
血小板因子-4 分解産物	不明	血管内皮細胞の増殖阻害
MMP-2 断片(PEX)	不明	MMP-2 阻害
レスチン	不明	血管内皮細胞の遊走阻害
フィブロネクチン分解産物	不明	血管内皮細胞の増殖阻害

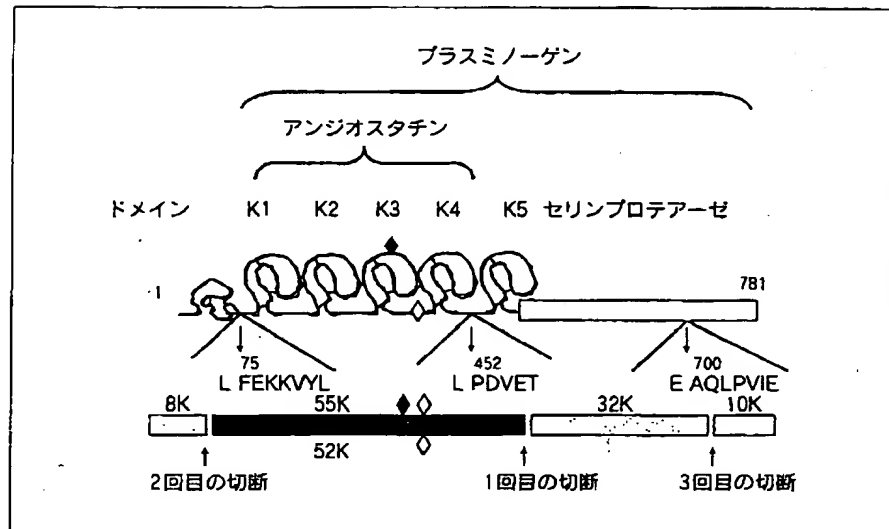


図1 カテプシンDによるアンジオスタチン産生機構

カテプシンDはプラスミノゲンを段階的に分解(L⁶⁵-P⁶²→L⁷⁴-P⁶²結合切断)し、4つのクリングドメイン(K1~K4)を含むアンジオスタチンを産生するとともに、プラスミンを切断(E⁶⁹-A⁷⁰結合切断)することによって強力な抗血管新生作用を発揮する。◆: N-結合型糖鎖、◇: O-結合型糖鎖。

表2 腫瘍におけるカテプシンDおよびカテプシンEの機能特性

	カテプシンD	カテプシンE
血管新生阻害機構	アンジオスタチン	エンドスタチン
基質	プラスミノゲン	コラーゲンXVII
最適pH	4.0	6.0
シアル酸含量	依存	依存せず
腫瘍増殖	抑制	抑制
転移	不明	抑制

た癌細胞からのカテプシンDはアンジオスタチン産生能が低く、悪性度の低い癌細胞からのカテプシンD分子はアンジオスタチン産生能が高い。その理由を探るために、各種腫瘍細胞からアンジオスタチン産生能の異なるカテプシンD分子を分離し、SDSゲル電気泳動や糖鎖分解酵素処理などにかけて比較検討した結果、アンジオスタチン産生能はカテプシンDのN-結合型糖鎖に含まれるシアル酸含量に逆比例することがわかった(表2)。もし、カテプシンDのシアル酸付加の程度が腫瘍細胞の悪性度に影響を与えるとするならば、腫瘍細胞中のシアル酸転移酵素の発現や性状を知ることによって、腫瘍の悪性度や予後を推定することが可能になるかもしれない。また、腫瘍の悪性度と腫瘍細胞の産生するカテプシンD分子の糖鎖構造の関係がさらに明確になれ

ば、カテプシンDによるアンジオスタチン産生亢進を目的とした新たな創薬基盤が構築できるものと期待される。

III. エンドスタチン産生とカテプシンE

エンドスタチンは同じく内性血管新生阻害因子として1997年にO'Reillyらにより初めて発見された¹⁰⁾。エンドスタチンはおもに血管周囲に局在するコラーゲンXVIIのC末端部分がプロテアーゼによって切断されてできる22Kのポリペプチドである。2000年、Felborらは、マウス血管内皮腫細胞株から分泌されるカテプシンLが

エンドスタチンを産生する酵素であることを報告した¹¹⁾。しかし、カテプシンLによって切断されたエンドスタチン断片は、ヒトにおいては検出されておらず、はたしてヒトにおいてカテプシンLがエンドスタチンの産生酵素であるかどうか不明であった。その後、MMP-9がエンドスタチン産生能を有することが報告された¹²⁾が、この場合もやはり切断部位がヒト・エンドスタチンと一致していなかった。また、MMP-9については、子宮内膜の血管新生の時期に一致してその発現が誘導されることから、エンドスタチンの責任酵素であるか疑問が残った。

最近、筆者らは、癌細胞から分泌されるカテプシンEがコラーゲンXVIIのC末端部位を特異的に切断し、エンドスタチンを産生することを見いだした。カテプシンEによって産生されるコラーゲンXVIIの切断部位は、ヒト血液中で同定されるエンドスタチンのN末端と一致した(図2)。悪性度の異なる各種のヒト前立腺癌細胞、乳癌細胞、口腔癌細胞、メラノーマ細胞から分泌されるプロテアーゼ活性を測定してみると、カテプシンE量のみが腫瘍細胞の悪性度や血管新生能と逆相関した。腫瘍細胞から分泌されるカテプシンEはほとんどが活性型分子で、コラーゲンXVIIやそのC末端フラグメント(NC1)を濃度依存性、時間依存性に分解しエンドスタチンを

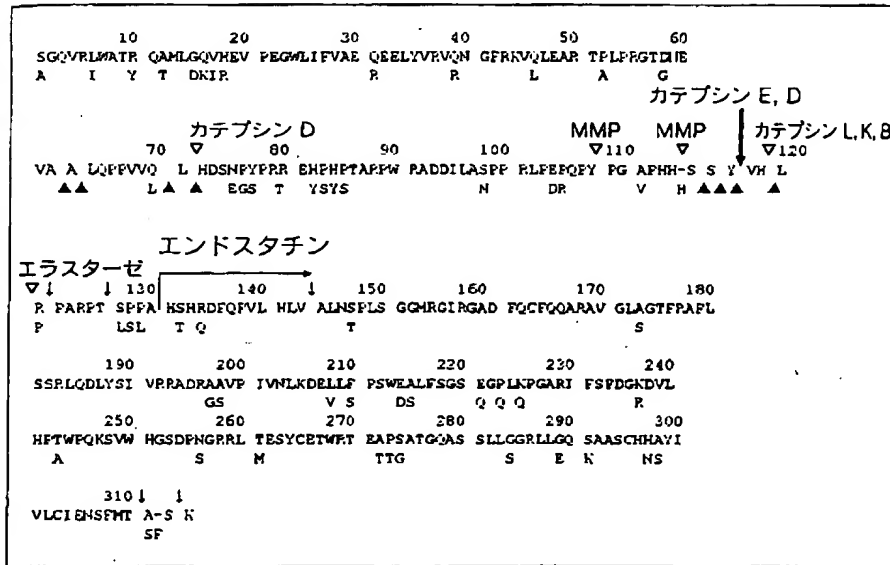


図2 各種プロテアーゼによるヒトコラーゲンXVIIIのC末端NC1領域の切断部位
ヒト血清中に検出されるエンドスタチンのN末端は、カテプシンEおよびカテプシンDによってY¹¹⁸-V¹¹⁹結合が特異的に切断されてできるVHLで始まるポリペプチドである。この部位の切断は、カテプシンDに比べカテプシンEのほうが強い。下段のアミノ酸配列はマウスコラーゲンXVIIIのうちヒトと異なるアミノ酸を示している。▲はマウス組織中より見つかったエンドスタチン、↓はヒト血液中より見つかったエンドスタチン、▽は各種プロテアーゼの*in vitro*実験での切断部位を示す。カテプシンDのL¹¹⁷-H¹¹⁸結合切断部位とカテプシンLのH¹¹⁸-L¹²⁰結合切断部位は、マウスで見つかったエンドスタチンとは一致したが、ヒトでは検出されていない。

表3 ヒト前立腺癌細胞培養上清中のカテプシンE量とエンドスタチン産生能および血管内皮細胞の管腔破壊の相関

細胞株	ALVA-41	LNcap	PC-3	PPC-1	DU-145	ALVA-101
カテプシンE量 (U/mg)	4.2	2.9	2.7	2.3	0.6	0.1
エンドスタチン産生量	多い					少ない
血管内皮細胞の管腔破壊量	多い					少ない

産生した(表2)。カテプシンEによって産生されたエンドスタチンを分離精製し、増殖している血管内皮細胞と休止期にある血管内皮細胞に作用させて比較検討してみると、休止期のものと比べ増殖期の内皮細胞に約100倍の感受性が認められた。また、血管内皮細胞にあらかじめ管腔を形成させておき、それにNC1と各種腫瘍細胞の培養上清を加えると、カテプシンE活性量に比例して血管内皮細胞はアポトーシスに陥り、形成された管腔は消失した(表3)。すなわち、カテプシンEを多く分泌する腫瘍細胞は、エンドスタチンの産生を介して血管新生を阻害し、同時に、高濃度では形成された血管の内皮細胞をアポトーシスに導くことが明らかとなった。

さらに、血管新生阻害機構におけるカテプシンEの役割を検証するために、カテプシンEをほとんど産生しない悪性のヒト前立腺癌細胞(ALVA-101)にヒトカテプシンEを過剰発現させ、ヌードマウス皮下に移植し

たところ、遺伝子を導入していない腫瘍細胞を移植したときに比べ、腫瘍の発育増殖がほとんど認められなかった。このとき、ヒトカテプシンE過剰発現ALVA-101は血管新生をほとんど誘導していないことが免疫組織学的に明らかにされた。また、ヒトカテプシンEを過剰発現させたALVA-101の培養上清は、*in vitro*のマトリゲルを使った血管形成に対しても強い阻害効果を示すこともわかった。ついで、別の悪性ヒト前立腺癌細胞をヌードマウスに移植しておき、精製したカテプシンEを増殖部位に投与すると、腫瘍細胞の発育増殖が有意に抑制された。同様に、局所の腫瘍細胞にヒトカテプシンE遺伝子をエレクトロポレーション法によって導入すると、腫瘍の発育増殖ならびに転移が有意に抑制された。

これまでに筆者らの研究から、カテプシンEは生体防御系において重要な役割を果たしていることが示されている。とくに、カテプシンEノックアウトマウスの解析から、本動物が一定環境下でアトピー性皮膚炎を発症することから、本酵素が細胞性免疫を担う重要酵素であることが示唆されている(投稿中)。そこで、腫瘍細胞だけではなく、生体側のカテプシンEが腫瘍細胞に対する生体防御にどう影響するのかを調べる目的で、マウスメラノーマ細胞をカテプシンEノックアウトマウスおよび野生型マウスに移植し腫瘍細胞の肺転移能を比較した。その結果、野生型マウスに比べて、カテプシンEノックアウトマウスでは、腫瘍細胞の肺転移が明らかに大きいことがわかった。このことは、腫瘍細胞から産生

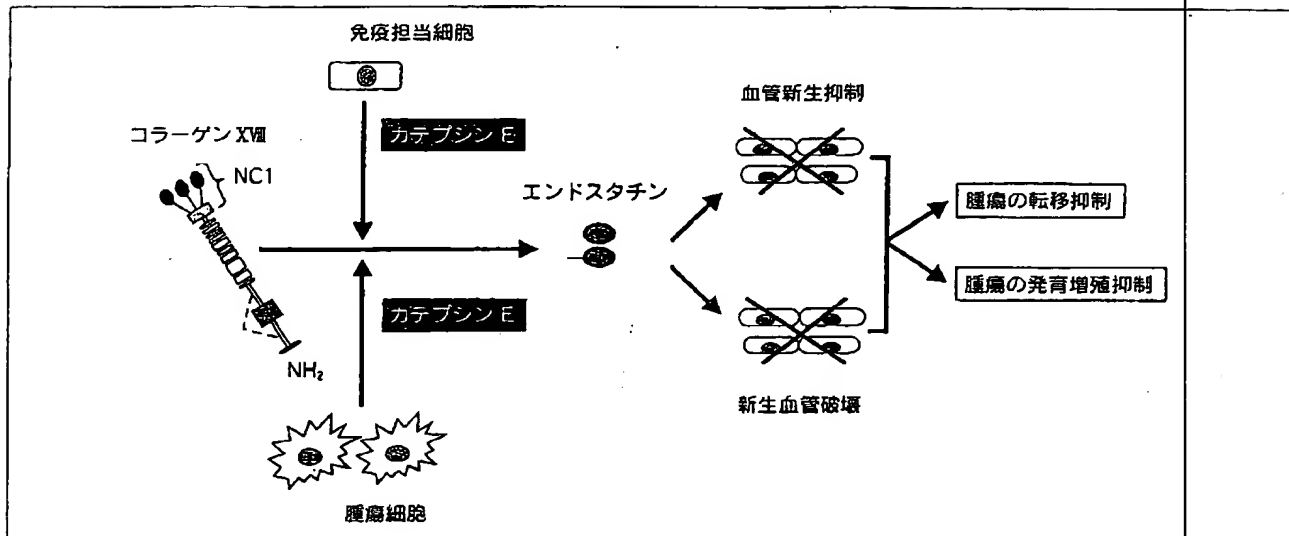


図3 カテプシンEによるエンドスタチン産生を介した腫瘍の発育増殖ならびに転移の抑制機構
腫瘍細胞から分泌されるカテプシンEはコラーゲンXVIIIを特異的に分解してエンドスタチンを産生し、腫瘍血管新生を抑制するとともに、一部、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する。その結果、腫瘍の発育増殖および転移の抑制が起こる。一方、抗原提示細胞やリンパ球から分泌されるカテプシンEは直接的または間接的に腫瘍の発育増殖および転移を抑制する可能性もある。

されるカテプシンEのみならず、宿主のもつカテプシンEも抗腫瘍作用をもつことを示している(図3)。

おわりに

現在、エンドスタチンの臨床試験は第Ⅱ相、アンジオスタチンの臨床試験は第Ⅰ相が行なわれており、これまでのところ重篤な副作用の報告はない。アンジオスタチンおよびエンドスタチンは、少なくともマウスの系においては強力な血管新生阻害活性をもつため、ヒト臨床試験においてもその劇的な効果が期待された。しかしながら、ヒト腫瘍のもつ多様性のためか、あるいは種の違いによるものかはわからないが、当初期待されたほどの効果はみられていない¹³⁾。その原因のひとつは、これらの阻害因子の作用機序についての分子生物学的な解析が十分ではなく、これら物質のもつ特徴を十分に発揮させる方法論が確立されていないことが考えられる。

筆者らは、すでに臨床的に、口腔癌患者血液中のカテプシンEが正常者に比べ有意に低下していることを見いだしており、今回の結果とあわせて、カテプシンEの発現や活性の低下が腫瘍細胞の増殖・転移を誘導する可能性を示唆している。腫瘍組織でカテプシンEによるエンドスタチン産生、カテプシンDによるアンジオスタチン産生が誘導されるならば、腫瘍血管新生が阻害され、腫瘍の発育増殖ならびに転移が抑制されると考え

られる。このことは、両酵素を含めた血管新生阻害因子産生関連分子が腫瘍の悪性度や予後のマーカーとなりうるばかりでなく、血管新生阻害療法に基づく癌治療に新たな道を開くものと期待される。

文献

- 1) DeClerck, Y. A., Imren, S.: *Eur. J. Cancer*, 30A, 2170-2180 (1994)
- 2) Sifacca, K.: *Future Oncology*, 1, 185-199 (1995)
- 3) Yamamoto, K.: *Proteases: New Perspectives* (ed. Turk, V.), pp. 59-71, Birkhäuser Verlag, Basel (1999)
- 4) Yasuda, Y., Ikeda, S., Sakai, H., Tsukuba, T., Okamoto, K., Nishishita, K., Akamine, A., Kato, Y., Yamamoto, K.: *Eur. J. Biochem.*, 266, 383-391 (1999)
- 5) O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, U., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., Folkman, J.: *Cell*, 79, 315-328 (1994)
- 6) Dong, Z., Kumar, R., Yang, X., Fidler, I. J.: *Cell*, 88, 801-810 (1997)
- 7) Gately, S., Twardowski, P., Stack, M. S., Cundiff, D. L., Grella, D., Castellino, F. J., Enghild, J., Kwaan, H. C., Lee, F., Kramer, R. A., Volpert, O., Bouck, N., Soff, G. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10868-10872 (1997)
- 8) Morikawa, W., Yamamoto, K., Ishikawa, S., Takemoto, S., Ono, M., Fukushi, J., Naito, S., Nozaki, C., Iwanaga, S., Kuwano, M.: *J. Biol. Chem.*, 275, 38912-38920 (2000)
- 9) Tsukuba, T., Okamoto, K., Yasuda, Y., Morikawa, W.

- Nakanishi, H., Yamamoto, K. : *Mol. Cells*, 6, 601-611 (2000)
- 10) O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., Folkman, J. : *Cell*, 88, 277-285 (1997)
 - 11) Felbor, U., Dreier, L., Bryant, R. A. R., Ploegh, H. L., Olsen, B. R., Mothes, W. : *EMBO J.*, 19, 1187-1194 (2000)
 - 12) Ferreras, M., Felbor, U., Lanhard, T., Olsen, B. R., Delaisse, J. M. : *FEBS Lett.*, 486, 247-251 (2000)
 - 13) von Moerselaar, R. J. A., Voest, E. E. : *Mol. Cell. Endocrinol.*, 197, 239-250 (2002)
 - 14) Khurana, S., Liby, K., Buckley, A. R., Ben-Jonathan, N. : *Endocrinology*, 140, 4127-4132 (1999)
 - 15) Cao, R., Wu, H., Veitonmaki, N., Linden, P., Farnebo, J., Shi, G., Cao, Y. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5728-5733 (1999)

岩田淳一

略歴：1974年 山口県に生まれる。2000年 九州大学歯学部卒業。同年 同大学院に進学し、現在博士課程4年。2003年より日本学術振興会特別研究員。研究テーマ：内在性血管新生阻害因子の産生機構の解明と血管新生抑制剤の開発。関心事・抱負：日本発の新しい癌治療への挑戦。

山本健二

略歴：1974年 九州大学大学院薬学研究科博士課程修了。1975年 九州大学歯学部助手。1983年 長崎大学歯学部助教授。1989年 九州大学歯学部教授。2000年 九州大学大学院歯学研究院教授。この間、1979～1981年 米国エール大学医学部博士研究員。研究テーマ：生体防衛系におけるプロテアーゼの機能と病態。

●workshop

日仏構造プロテオミクスワークショップ

日 程	2003年11月10日(月)～12日(水)
場 所	10日：東京大学弥生講堂一条ホール 11・12日：東京大学農学部1号館8番教室
内 容	日仏構造ゲノムプロジェクト実施機関研究代表者らによる研究現状報告、意見交換。仏人12名、日本人14名、あわせて26講演予定。時間、講演者などの詳細情報はワークショップホームページをご参照下さい。
参加費	無料
定 員	200名
申込方法	ホームページからお申し込み下さい。当日参加も可能ですが、事前申込みをされた方を優先とさせていただきます。なお、事前申込みは定員になり次第締切とさせていただきますので、ご了承下さい。
問合せ先	日仏構造プロテオミクスワークショップ実行委員会事務局 E-mail: wfj-info@gsc.riken.go.jp FAX 045-503-9195
主 催	日仏構造プロテオミクスワークショップ実行委員会
実行委員会幹事会	Dino Moras (IGBMC, CNRS Strasbourg), Jean-Claude Thierry (IGBMC, CNRS Strasbourg), Christian Cambilau (CNRS-Univ. Aix-Marseille I & II), Joel Janin (CNRS, Gif-sur-Yvette, Paris), 大島泰郎(東京薬大, 委員長), 中村孝木(阪大), 田之倉 優(東大), 若槻社市(高エネ機構・物構研), 西村善文(横浜市大), 横山茂之(理研 GSC, 東大), 黒田 裕(理研 GSC)

<http://bio.gsc.riken.go.jp/WFJ-2003>

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.